UNIVERSITATEA DE ŞTIINȚE AGRICOLE ŞI MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA
ŞCOALA DOCTORALĂ
FACULTATEA DE ZOOTEHNIE ŞI BIOTEHNOLOGII

Ing. chimist ANTONIA CRISTINA MARIA M. ODAGIU

TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI PRIVIND DEZVOLTAREA ŞI VALIDAREA UNEI METODE DE GENOTIPIZARE A PARAZITULUI *VARROA* SP. PREZENT ÎN STUPINELE DIN ZONA TRANSILVANIEI
(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

CONDUCĂTOR ŞTIINȚIFIC
Prof. univ. dr. AUGUSTIN VLAIC

CLUJ – NAPOCA
2010

Teza de doctorat intitulată „**CERCETĂRI PRIVIND DEZVOLTAREA ŞI VALIDAREA UNEI METODE DE GENOTIPIZARE A PARAZITULUI *VARROA* SP. PREZENT ÎN STUPINELE DIN ZONA TRANSILVANIEI"** îşi propune dezvoltarea unei metode de identificare a genotipului căruia îi aparţine parazitul *Varroa* sp. prezent în stupinele din Transilvania, precum şi caracterizarea parametrilor de performanţă a metodei în condiţiile Laboratorului Zonal de Genotipizare a Animalelor al Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj – Napoca, în vederea validării procedurii.

INTODUCERE

Datorită importanţei mierii cât şi a produselor apicole secundare (polen, lăptişor de matcă, propolis, ceară) tributară factorilor nutritivi pe care îi conţin precum şi acţiunii terapeutice a acestora, prevenirea şi combaterea bolilor albinelor constituie una dintre preocupările majore ale apicultorilor pe plan mondial (Bura M., 1996; Dezmirean D. şi colab., 2008; Mărghitaş L. Al., 2002).

Un alt factor ce contribuie la importanţa păstrării stării de sănătate a albinelor, îl constituie calitatea lor de vector în procesul de polenizare al plantelor, dar şi de perspectivele deschise de progresul biotehnologiilor care le transformă în virtuali agenţi de vehiculare al transgenelor provenite de la plantele modificate genetic (Dezmirean D. şi colab., 2007; Rakosy-Tican Elena, 2005).

În acest context, o tot mai mare importanţă se acordă factorilor genetici care sunt implicaţi în rezistenţa naturală a unor specii sau populaţii de albine la agenţi patogeni specifici, sau paraziţi, dar şi a paraziţilor la acţiunea produselor destinate combaterii lor.

CAPITOLUL I
ASPECTE PRIVITOARE LA COMPORTAMENTUL IGIENIC AL *APIS MELLIFERA* L.

Bolile albinelor pot fi de natură necontagioasă sau contagioasă. Cele de natură necontagioasă au cauze fiziologice, pe când cele contagioase sunt provocate de agenți bacterieni, virali, micotici, sau paraziți (Mărghitaş L. Al., 2002).

Datorită efectelor sale extrem de nocive şi răspândirii largi *Varroa destructor* (*jacobsoni*) constituie o problemă majoră pentru apicultorii din întreaga lume. *Varroa* sp. este un parazit ce face parte din regnul **Animalia**, încrengătura **Arthropoda**, Clasa **Arachnida**, Ordinul **Acari**, Familia **Parasitidae**, Genul **Varroa**, Specia ***destructor*** (Drees B.M. şi colab., 1999).

Combaterea eficientă a parazitului constituie una dintre cele mai mari provocări ale apicultorilor din întreaga lume (Tew J. E., 2000; Moosbeckhofer R. şi colab., 2003; Donzé G., 1998; Al-Abbadi A. şi colab., 2003). Una dintre cele mai mari probleme ale apicultorilor de azi constă în rezistența parazitului la tratamentul cu **Apistan** (pesticid piretroid având component activ tau – fluvalinatul), una dintre substanțele cu cea mai mare utilizare în combaterea *Varroa destructor*, dar şi la cele cu Amitraz şi Cumafos (Pettis J. S., 2003).

Rezistența parazitului *Varroa* sp. la principalii produşi de combatere, bazați pe piretroizi s-ar putea explica prin mecanisme identificate la momentul de față. Aceasta, însă, în contextul mai larg al dezvoltării rezistenței la pesticide atât a plantelor cât şi al altor organisme (echinoderme, insecte, arahnide etc.), care se pare că sunt guvernate de procese similare (Doyle K. şi colab., 1991; Sibbesen O. şi colab., 1995; Besten P.J., 1998; Valles S.M. şi colab., 2003; Tan J. şi colab., 2005; Eleftherianos I. şi colab., 2008, ş.a.).

Unul dintre ele este reprezentat de prezența anumitor esteraze (monooxigenazele), care stau la baza unui mecanism metabolic de rezistență specific, mediat de acestea - detoxifierea. În prezența monooxigenazelor piretroizii sintetici sunt oxidați, ceea ce conduce la anihilarea activității lor toxice asupra paraziților (Sammataro Diana şi colab., 2005). Aceste monooxigenaze fac parte dintr-un grup mai extins (Lewis D. F.V., 2001) localizat în reticulul endoplansmatic şi este desemnat ca Citocrom P – 450 (CYP sau P450). Acestea

aparţin superfamiliei de proteine care conţin cofactorul Hem (hemoproteine). Denumirea atribuită acestui grup enzimatic se datorează localizării celulare a acestora (**cito**), dar şi caracteristicilor spectrofotometrice (**crom**) – când fierul din Hem este redus, P450 absoarbe radiaţiile luminoase cu lungimea de undă carcteristică de 450 nm.

Reacţia de bază prin care Citocromul P450 îşi manifestă rolul catalitic, este tipică monooxigenazelor (oxidare prin introducerea unui atom de oxigen într-un substrat organic – RH şi reducere prin formarea apei cu participarea celuilalt atom de oxigen):

$$RH + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O$$

La echinoderme a fost evidenţiată dependenţa de P450 a metabolismului compuşilor piretroidici (Besten P. J. şi colab., 1990; Besten P. J., 1998).

În cazul insectelor, a fost confirmată prezenţa oxidazelor din complexul enzimatic microzomal P450, care utilizează sistemul NADPH/NADH pentru a cliva reducător oxigenul atmosferic, conducând la o funcţiune organică şi o moleculă de apă (Schuler Mary A., 1996; Dong K., 2007; Soderlund D. M., 2008). Descrierea acestor mecanisme a facilitat explicarea fenomenului de rezistenţă a parazitului *Varroa* sp. la piretroizi. Pe baza lor tulpinile rezistente la produşii de combatere şi-au dezvoltat capacitatea de a detoxifica insecticidele prin oxidare.

Celălalt mecanism al rezistenţei poate fi explicat prin mutaţiile punctiforme produse la nivelul genei, care controlează canalele sodiului. Canalele sodiului caracterizate de un potenţial electric sunt constituite integral din proteine transmembranare şi sunt responsabile de faza de creştere rapidă a potenţialului de acţiune al celulei care face parte din categoria celor cu excitabilitate ridicată. Insecticidele piretroide au efect de reducere a cineticii activării şi dezactivării canalului sodiului. Consecinţa directă este deschiderea prelungită a canalelor individuale, ceea ce conduce la paralizia şi în final moartea insectelor ce vin în contact cu aceşti compuşi (Wang R. şi colab., 2002; Wang R. şi colab., 2003; Wang, R. şi colab., 2003). Multe dintre insectele ce prezintă rezistenţă la piretroizi au suferit mutaţii punctiforme la nivelul genei canalului sodiului. Teste efectuate asupra oocitelor de *Xenopus* ce au exprimate canalele sodiului, au demonstrat că aceste mutaţii reduc sensibilitatea acestor canale la piretroizi, ceea ce confirmă faptul că acesta reprezintă mecanismul major de rezistenţă la piretroizi la diverse specii de insecte (Soderlund D.M. şi colab., 2003).

Wang R şi colab. (2003) au reuşit să evidenţieze gena pentru canalul sodiului de la arahnide – gena ***VmNa*** şi la *Varroa destructor* O. Izolarea integrală a genei VmNa a reprezentat un moment important pentru caracterizarea completă a modului de funcţionare a acestui mecanism de rezistenţă la produse pe bază de piretroizi.

Cel mai cunoscut mecanism de rezistenţă a albinelor la boli şi dăunători, pe baza căruia se poate realiza selecţia, este datorat comportamentului igienic al acestora, descris iniţial de Park O.W. (1937), citat de Morse, R.A. & Flottum, K. Eds., 1997. Acest comportament complex constă în două activităţi distincte desfăşurate în două etape successive (Lapidge K.L. şi colab., 2002). Primul implică descăpăcirea celulelor în care se află larvele infestate, iar cel de al doilea constă în eliminarea efectivă a corpului larvei din celulele descăpăcite. Pornind de la constatările lui Park (1937), Rothenbuhler (1964a,b) presupune existenţa a două mecanisme diferite care stau la baza controlului acestor activităţi. Conform acestei aserţiuni, fiecare dintre aceste două activităţi este controlată de o genă cu două alele, iar comportamentul este transmis la descendenţi conform mecanismului mendeleean. Spre exemplu, dacă împerecherea se produce între **un trântor** a cărui comportament igienic este controlat de **ambele alele recesive** şi o **matcă** ce posedă doar **câte o alelă recesivă** pentru fiecare tip de comportament, vor rezulta doar **doi descendenţi** (un trântor şi o albină) ce posedă **ambele alele recesive** (fig. 3).

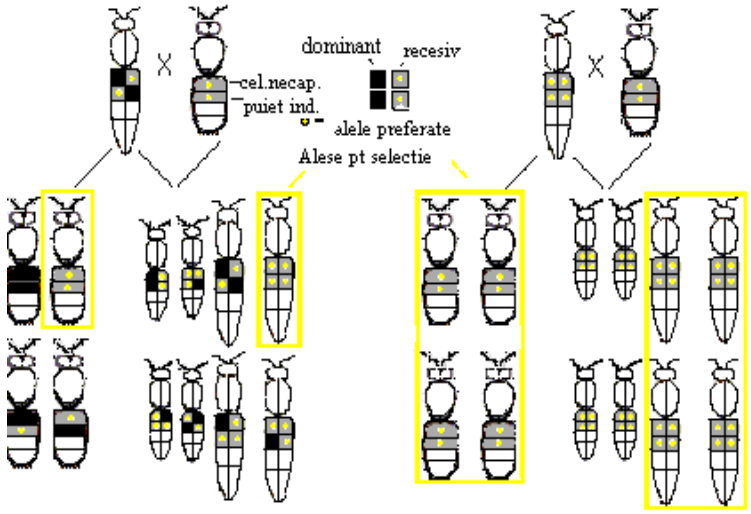


Fig. 3. Transmiterea comportamentului igienic la *Apis mellifera* L.
(http://members.aol.com/queenb95/genetics.html)

CAPITOLUL II
BAZELE TEORETICE ALE METODOLOGIEI DE GENOTIPIOZARE A PARAZITULUI *VARROA* SP.

După prelevarea şi conservarea probelor în condiţiile impuse de protocol, procedeul implică: extracţia ADN, amplificarea, restricţia, migrarea în gel de agaroză şi secvenţierea.

Izolarea ADN trebuie să fie caracterizată de o eficienţă cât mai mare, precum şi de obţinerea unei cantităţi suficiente, de puritate corespunzătoare, care mai apoi să poată fi utilizată în scopul amplificării, migrării şi eventual secvenţierii atunci câd scopul final al analizei o impune (Vlaic A., 1997; Vlaic A. şi colab., 2005). Cea mai utilizată metodă de cuantificare a probelor de ADN se bazează pe spectrofotometria de absorbţie moleculară în UV. Acizii dezoxiribonucleici dublu catenari prezintă un maximum de absorbţie la $\lambda = 260$ nm. Majoritatea probelor, însă, conţin contaminanţi, respectiv proteine şi ADN şi/sau ARN unicatenar, cu un maximum de absorbţie la $\lambda = 280$ nm. O altă categorie de contaminanţi specifici acestui tip de probe este reprezentată de fenoli şi tiocianaţi, cu un maximum de absorbţie la $\lambda = 230$ nm. Reacţia în Lanţ a Polimerazei - PCR se bazează pe caracteristicile replicării ADN-ului. Este o tehnică rapidă, care permite obţinerea în cantităţi suficiente, pentru scopuri analitice, a unor fragmente specifice de ADN aflate iniţial în cantităţi foarte reduse. În studiul de faţă s-a recurs la adoptarea tehnicii perfecţionate de amplificare, respectiv Real Time – PCR (RT – PCR). **Principiul metodei** se bazează pe faptul că fiecare probă suferă o amplificare PCR în prezenţa unui fluorocrom prezent în amestecul de reacţie, care produce fluorescenţă doar atunci când produsul specific este recunoscut sau sintetizat. Pragul de fluorescenţă rezultă din analiza curbei de reacţie şi este determinat în partea liniară a acesteia. El corespunde fazei în care se înregistrează cea mai mare eficienţă a amplificării. Tehnica RFLP se bazeaza pe existenţa, în genomul organismului studiat (*Varroa* sp. în cazul de faţă), a unor situs-uri de restricţie, asupra cărora acţionează specific anumite enzime, numite enzime de restricţie. În urma acţiunii acestora, se produce tăierea macromoleculei de ADN şi obţinerea unor fragmente de diferite lungimi. Distribuţia situsurilor de restricţie corespunzătoare unei anumite enzime este specifică pentru fiecare specie (Vlaic A. şi colab., 2008).

CAPITOLUL III

CONCEPTUL DE VALIDARE DE METODE

Procedura de **validare** a unei metode analitice nou elaborate sau existente urmăreşte demonstrarea faptului că acea metodă corespunde scopului utilizării pentru care a fost elaborată sau selectată şi că performanţele sale caracteristice, stabilite prin studii de laborator, satisfac cerinţele pentru ca metoda să poată fi aplicată. Principalii parametri care fac obiectul validării sunt: **selectivitate/specificitate, precizie, exactitate, domeniul de lucru, liniaritate, limită de detecţie, limită de cuantificare, robustețe, sensibilitate, incertitudine**. Aceste criterii sunt prevăzute şi în normele ISO şi ale IUPAC şi, prin urmare, şi în nota explicativă a Comisiei de specialitate a Uniunii Europene.

CAPITOLUL IV
SCOPUL OBIECTIVELE ŞI IMPORTANŢA CERCETĂRII

Scopul tezei de doctorat a vizat două problematici în strânsă conexiune, respectiv ***identificarea genotipului*** speciei care parazitează *Apis mellifera carpatica* L. în Transilvania, precum şi ***propunerea spre validare a metodei de genotipizare pe bază de ADN*** provenit de la parazitul *Varroa* sp. în condiţiile Laboratorului Zonal de Genotipizare a Animalelor Domestice a USAMV Cluj – Napoca, luând în considerare prezenţa şi importanţa comportamentului igienic al albinei melifere în rezistenţa la acţiunea parazitului *Varroa*.

Planul experimental al cercetării a prevăzut luarea în studiu a comportamentului igienic al albinelor localizate randomizat în stupine din cele 10 judeţe din Transilvania (Alba, Bistriţa - Năsăud, Braşov, Cluj, Covasna, Harghita, Hunedoara, Mureş, Sălaj şi Sibiu), precum şi dezvoltarea unei metode de genotipizare a parazitului *Varroa* sp. şi validarea acesteia în condiţiile Laboratorului Zonal de Genotipizare a Animalelor Domestice a USAMV Cluj - Napoca.

Importanța cercetării

La noi în țară, nu au fost efectuate studii moleculare asupra caracteristicilor parazitului *Varroa* sp. şi de asemenea, nu a fost întreprins un studiu integrat ce vizează implicarea comportamentul igienic al varietății autohtone de albine în rezistența la boli în greneral şi la *Varroa* sp. în particular.

Procedeul de validare a unei metode analitice nou elaborate sau existente urmăreşte demonstrarea faptului că acea metodă corespunde scopului utilizării pentru care a fost elaborată sau selectată şi că performanțele sale caracteristice, stabilite prin studii de laborator, satisfac cerințele pentru ca metoda să poată fi aplicată (Kennedy S., 1997). În validarea metodelor analitice principalii parametri care fac obiectul validării sunt: selectivitate/specificitate, precizie, exactitate, domeniul de lucru, liniaritate, limită de detecție, limită de cuantificare, robustețe, sensibilitate şi incertitudine. Aceste criterii sunt prevăzute şi în normele ISO şi IUPAC .

Enunțate fiind principiile generale care stau la baza procedeelor de validare, trebuie subliniat faptul că acestea prezintă caracteristici specifice pentru fiecare tip de analiză şi, de asemenea, sunt specifice şi pentru laboratoarele în care sunt aplicate. În consecință, implementarea acestora în laboratoarele de genetică moleculară prezintă o serie de particularități, trebuind să răspundă unor exigențe specifice (OECD, 2007; Jennings L. şi colab., 2009).

În acest context, prezentul studiu îşi aduce aportul la caracterizarea metodei analitice de de izolare, cuantificare şi amplificare a ADN din parazitul *Varroa destructor* O. Din punct de vedere al performanțelor analitice şi totodată rezultatele obținute permnit încadrarea aacestora în categoria celor care pot parcurge cu succes exigențele procedeelor de validare în condițiile asigurării calității în laboratoarele de biologie moleculară (IUPAC, ISO: 2005, 17025).

Genotipizarea are un potențial ridicat în depistarea tulpinilor aparținând *Varroa s*p. care au dezvoltat rezistență la tratamentul chimic şi a căror existență a fost demonstrată încă din anii ’90 (ben Hamida T., 1997). În urma aplicării genotipizării şi confruntării cu datele din literatură se pot evita cheltuieli inutile cu achiziționarea şi

aplicarea tratamentelor cu Amitraz, Apistan, Cumafos ş.a. care se dovedesc ineficiente şi aplicarea directă a unor soluții diferite de combatere.

CAPITOLUL V
EVIDENȚIEREA COMPORTAMENTULUI IGIENIC LA *APIS MELLIFERA* CARPATICA L. DIN ZONA TRANSILVANIEI

Rezultatele obținute demonstrează că în nici una dintre stupinele studiate, familiile de albine analizate nu au manifestat comportament igienic, procentul mediu de descăpăcire a înregistrat valoarea maximă în județul Cluj, maximumul înregistrat fiind de 78,72%, situat mult sub limita de 91% de la care familiile de albine se consideră că manifestă rezistență naturală la boli şi paraziți ca urmare a comportamentului igienic.

Cea mai mică medie pentru procentul de descăpăcire a fost înregistrată în județul Harghita, 67,54%.

CAPITOLUL VI
REZULTATE PRIVIND DEZVOLTAREA METODEI DE GENOTIPIZARE A PARAZITULUI *VARROA* SP. PREZENT ÎN STUPINELE DIN ZONA TRANSILVANIEI

Acest demers constituie un proces laborios care implică o succesiune de etape (fig. 30).

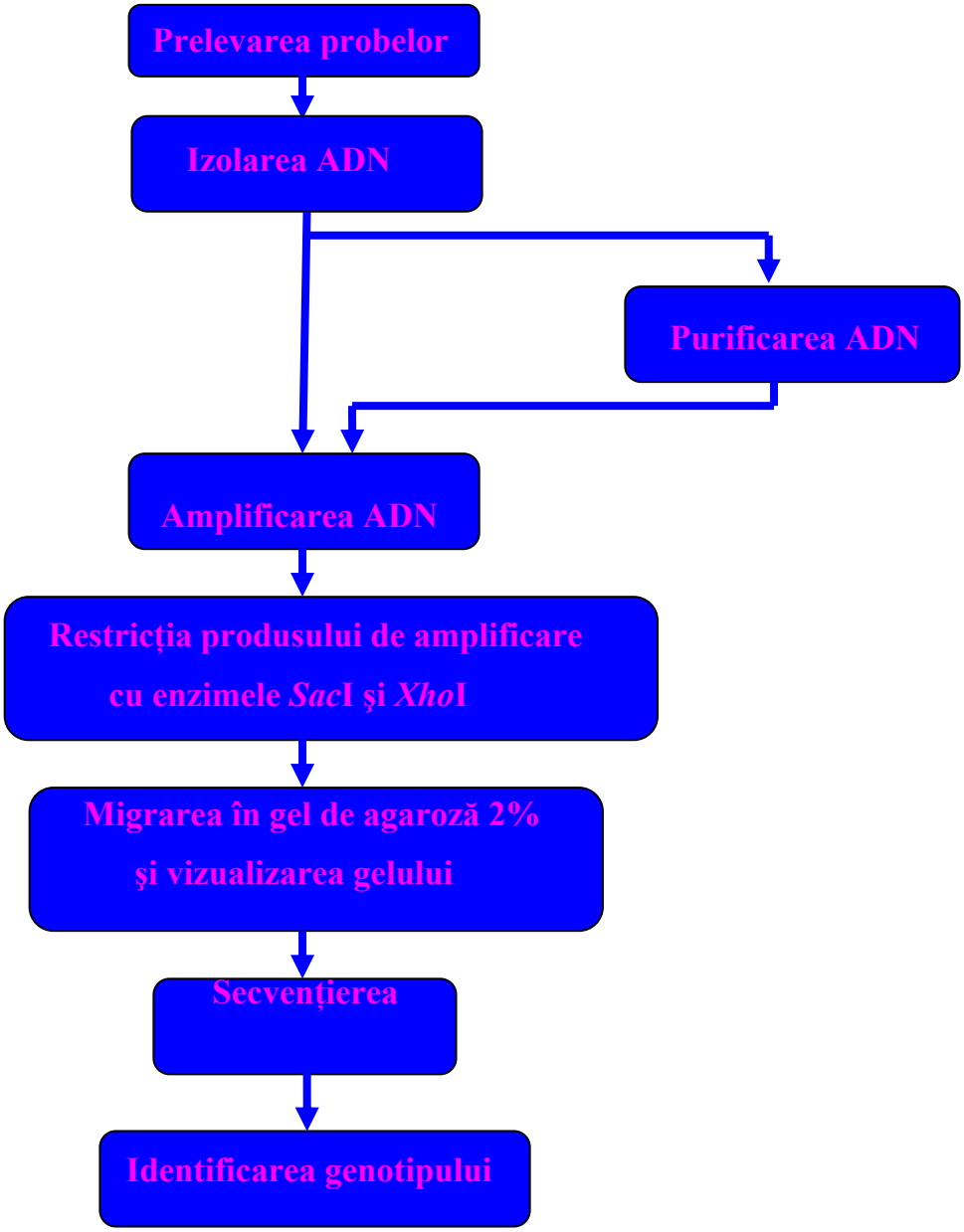
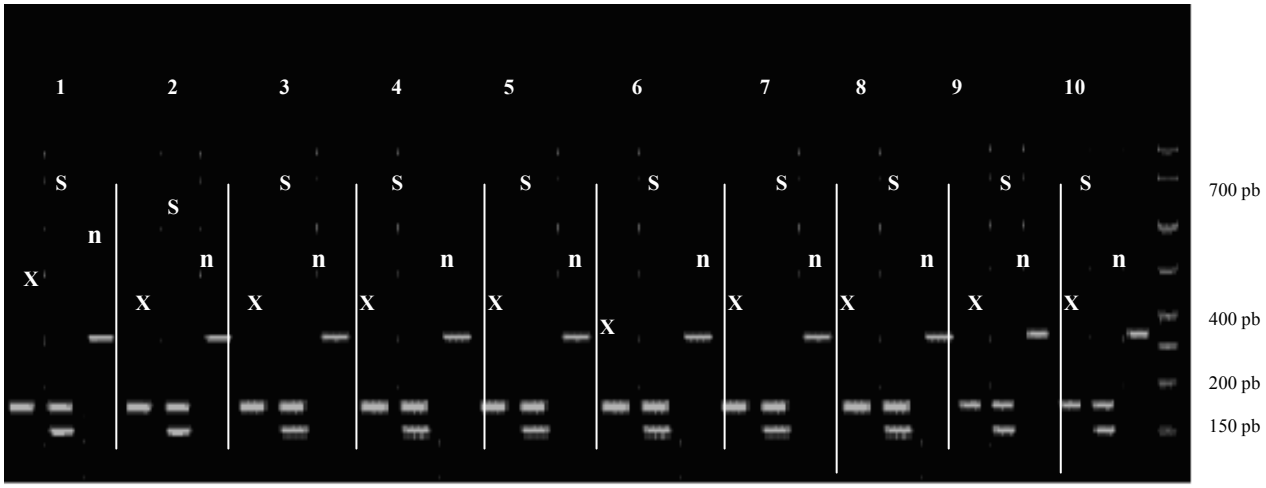


Fig. 30. Etapele procesului de genotipizare a parazitului *Varroa* sp.

În urma migrării produsului de amplificare supus restricției cu enzimele ***Xho I*** şi ***Sac I*** a rezultat profilul electroforetic al celor 10 migrări, fiecare corespunzătoare unei zone de colectare a paraziților (fig. 36).



1- Alba, 2 – Bistrița – Năsăud, 3 – Braşov, 4 - Cluj, 5 - Covasna, 6 - Harghita,
7 - Hunedoara, 8 - Mureş, 9 - Sălaj, 10 – Sibiu, **X** – ***Xho I***, **S** – ***Sac I, n – fragment nedigerat***

Fig. 36. Profilul electroforetic al probelor de ADN provenit de la parazitul *Varroa* sp. obținut în urma restricției cu enzimele ***Sac I*** şi ***Xho I*** (original)

Secvențierea a fost realizată de către compania Mycrosinth în Elveția. Rezultatele secvențierii au evidențiat structura de interes prezentă în subunitatea I a genei mitocondriale citocromoxidazei (CO – I) a paraziților aparținând genotipului *Varroa* sp. recoltați din stupine localizate în Transilvania. A rezultat următoarea secvență (în format FASTA):

ATTTATTTTGATTTTTTGGACACCCAGAAGTTTATATTTTAATTTTGCCTGGTTTTGGTATTATTTCTCAGTA
ATTTGTATACAGAGAGGGAAGAAGCAGCCTTTTGGAAATTTAGGGATAATTTACGCTATAATAACTATTG
GTATTTTAGGTTTTATTGTATGAGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATATTGATACTCGAGCATAT
TTTACTGCAGCTACAATAATTATTGCGGTTCCTACTGGTATTAAAATTTTTTCTTGATTAGCAACAATTCAT
GGTTCTATAGTTAAATTAGATGTCCCAATAATTTGATCTTTAGGTTTTATTTTTTTATTTACTTTAGGGGGT
ATTACTGGTGTAATTTTAGCTAATTCTTCTATTGATATTGTTTTACATGATACTTATTATGTAGTAGCACAT
TTTCACTATGTATTAAGAATAGGGGCT

Compararea structurii secvenței izolate de noi din ADN provenit de la indivizi *Varroa* sp. prezenți în stupinele din Transilvania, cu genotipurile existente în baza de date NCBI, a cărei rezultat a constat în suprapunerea de 100% cu secvențele cu numerele de acces **AF106900.1, AJ84872.1.**şi **AY372063.1** (fig. 40), a condus la constatatrea că genotipul *Varroa* existent în Transilvania coincide cu genotipul China 2, ce parazitează *Apis cerana* în Asia.

```
Query  1    atttattttgatttttttggacacccagaagtttatattttaattttgcctggttttggta  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    ATTTATTTTGATTTTTTGGACACCCAGAAGTTTATATTTTAATTTTGCCTGGTTTTGGTA  60

Query  61   ttatttCTCATGTAATTTGTATACAGAGAGGGAAGAAGCAGCCTTTTGGAAATTTAGGGA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   TTATTTCTCATGTAATTTGTATACAGAGAGGGAAGAAGCAGCCTTTTGGAAATTTAGGGA  120

Query  121  TAATTTACGCTATAATAACTATTGGTATTTTAGGTTTTATTGTATGAGCTCATCATATAT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  TAATTTACGCTATAATAACTATTGGTATTTTAGGTTTTATTGTATGAGCTCATCATATAT  180

Query  181  TTACAGTAGGAATAGATATTGATACTCGAGCATATTTTACTGCAGCTACAATAATTATTG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  TTACAGTAGGAATAGATATTGATACTCGAGCATATTTTACTGCAGCTACAATAATTATTG  240

Query  241  CGGTTCCTACTGGTATTAAAATTTTTTCTTGATTAGCAACAATTCATGGTTCTATAGTTA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  CGGTTCCTACTGGTATTAAAATTTTTTCTTGATTAGCAACAATTCATGGTTCTATAGTTA  300

Query  301  AATTAGATGTCCCAATAATTTGATCTTTAGGTTTTAttttttATTTACTTTAGGGGGTA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  AATTAGATGTCCCAATAATTTGATCTTTAGGTTTTATTTTTTTATTTACTTTAGGGGGTA  360

Query  361  TTACTGGTGTAATTTTAGCTAATTCTTCTATTGATATTGTTTTACATGATACTTATTATG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  TTACTGGTGTAATTTTAGCTAATTCTTCTATTGATATTGTTTTACATGATACTTATTATG  420

Query  421  TAGTAGCACATTTTCACTATGTATTAAGAATAGGGGCT  458
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  TAGTAGCACATTTTCACTATGTATTAAGAATAGGGGCT  458
```

Fig. 40. Secvențele genotipurilor originale China 2 (Anderson şi Trueman, 2000; Ting Y. şi colab., 2004; Solignac M. şi colab., 2005) obținute pentru *Varroa destructor* şi a celor obținute în stupinele din Transilvania

CAPITOLUL VII
VALIDAREA METODEI DE GENOTIPIZARE A PARAZITULUI *VARROA DESTRUCTOR* O.

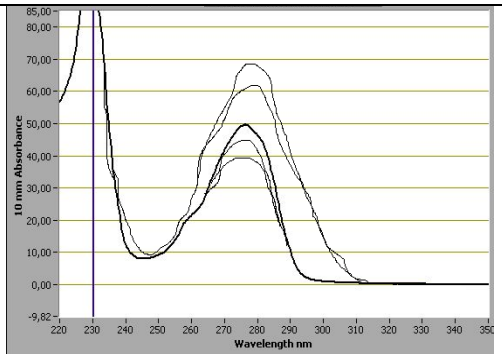
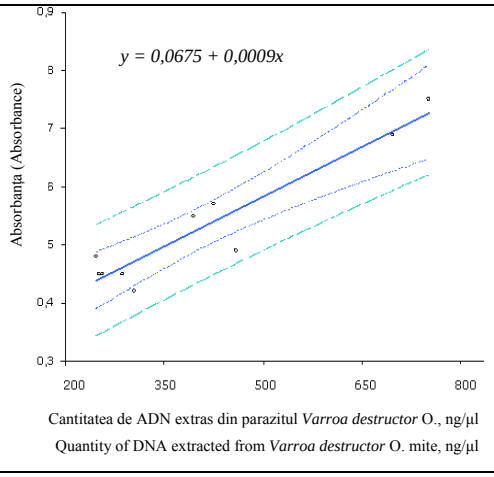
Pe baza testării parametrilor de reacție implicați în procedeul de izolare a ADN din parazitul *Varroa destructor* O., a fost elaborat un flux de operații care au avut drept rezultat dezvoltarea unei metode de izolare şi cuantificare a ADN.

În urma caracterizării parametrilor de performanță ai metodei (selectivitate/ specificitate, precizie, exactitate, parametrii analizei de regresie liniară, liniaritate, domeniul

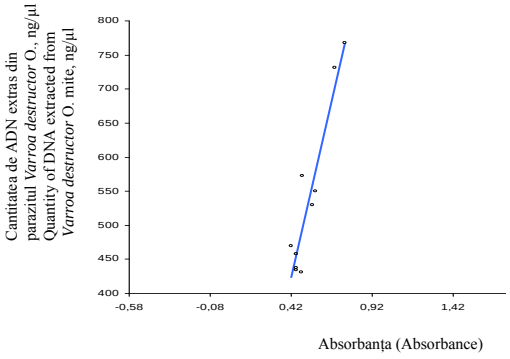
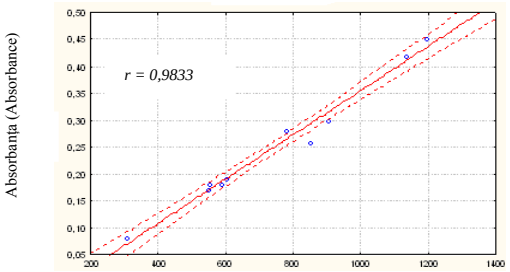
de lucru, test de liniaritate, limită de detecție, limită de cuantificare robustețe, şi incertitudinea de măsurare) a rezultat că procedeul are o capabilitate (proficiency) corespunzătoare şi este în conformitate cu scopul pentru care a fost selectat (tabelul 25).

Tabelul 25

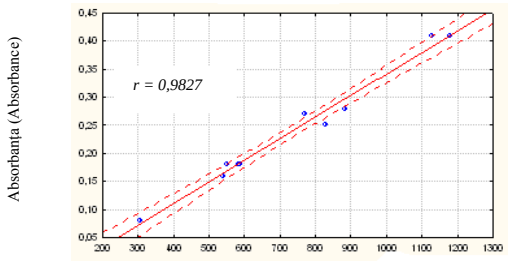
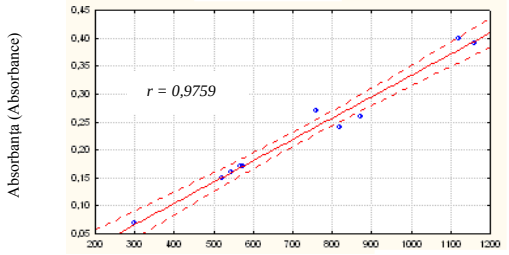
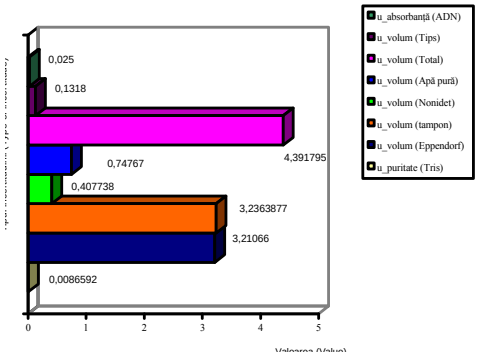
Gradul de îndeplinire a criteriilor de validare selectate pentru metoda spectrofotometrică de absorbție moleculară UV-VIS dezvoltată în vederea cuantificării ADN izolat din parazitul *Varroa destructor* O.

Parametrul	Rezultat impus	Rezultat realizat
1	2	3
Selectivitatea	Obținerea spectrului de absorbție moleculară UV-VIS la λ = 230 nm, λ = 260 nm şi respectiv λ = 280 nm, pentru diferite cantități de ADN (ng/µl) izolate de la parazitul *Varroa destructor* O. **Tehnică specifică**	
Precizia	RSD% < 3,50	Repetabilitate RSD% = 1,98% Precizia intermediară RSD% = 1,64%
Exactitatea	85% ≤ R ≤ 105%	R = 99,60%
Parametrii analizei de regresie liniară	Curba de etalonare are o reprezentare liniară de forma y = a + bx	

Tabelul 25 – continuare

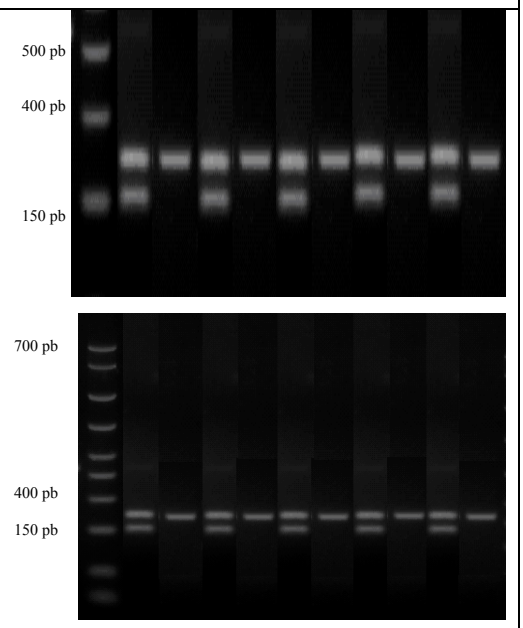
1	2	3
Liniaritate	Dispersie redusă a valorilor individuale în jurul dreptei de regresie	
Domeniu de lucru	Testul de omogenitate a dispersiilor Valoarea de încercare PG < 5,35	PG = 1,484
Testul de liniaritate		Valoarea abaterii standard reziduale (0,8139) indică o dispersie redusă a valorilor individuale în jurul liniei de regresie calculate.
Limita de detecție şi limita de cuantificare	Limita de cuantificare trebuie să fie **superioară cu cel puțin un ordin de mărime** Limitei de detecție	x_{LC} = 0,002500 ng/µl x_{LD} = 0,000859 ng/µl
Robustețea	Influența minimă a variațiilor parametrilor metodei -Stabilitatea în timp a soluției de ADN izolat din parazitul *Varroa destructor* O.	**Metoda are un caracter robust, din punct de vedere a stabilității în timp a soluției de ADN** ($r_{proaapăt}$, r_{48h} şi r_{96h}).  - izolat ADN proaspăt -

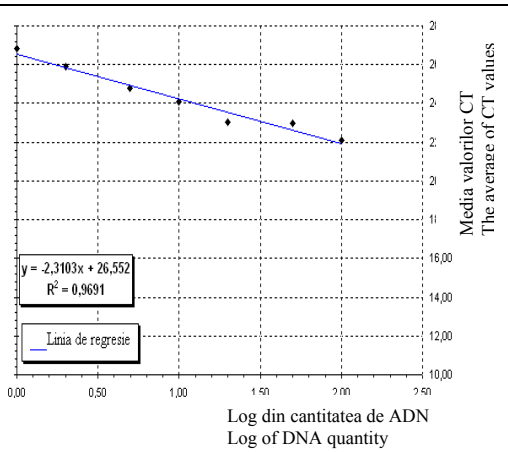
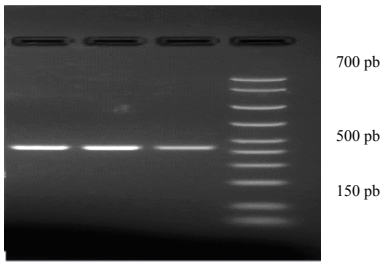
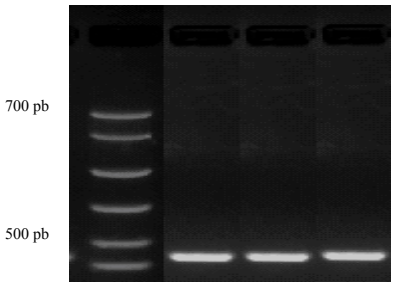
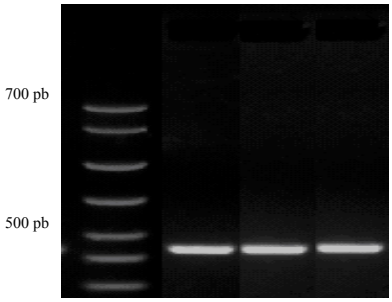
Tabelul 25 – continuare

1	2	3
		 Cantitatea de ADN extras din parazitul *Varroa destructor* O., ng/µl Quantity of DNA extracted from *Varroa destructor* O. mite, ng/µl - izolat ADN la 48 ore după preparare –  Cantitatea de ADN extras din parazitul *Varroa destructor* O., ng/µl Quantity of DNA extracted from *Varroa destructor* O. mite, ng/µl - izolat ADN la 96 ore după preparare –
	-Influența temperaturii	Metoda are un caracter robust dacă se lucrează la temperatura ambientală normală 15 - 20^{0}C şi se evită variațiile de temperatură (tabelul 21).
Incertitudinea de măsurare	Stabilirea bugetului de incertitudini.	Cea mai mare contribuție le bugetul de incertitudini este adusă de volumul total de soluție supusă cuantificări (soluție tampon + ADN izolat). 

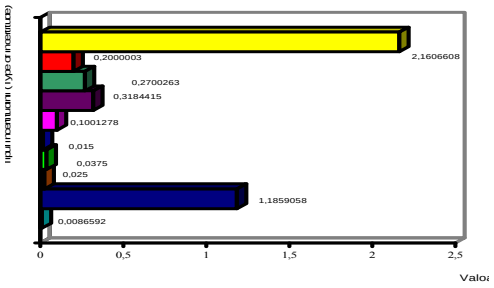
Tabelul 32

Gradul de îndeplinire a criteriilor de validare selectate pentru metoda de amplificare a fragmentului de ADN mitocondrial localizat la nivelul genei CO-I a parazitului *Varroa destructor* O.

Parametrul	Rezultat impus	Rezultat realizat
1	2	3
Limita de detecție	Amplificarea devine vizibilă după un număr redus de cicluri de amplificare (< 21)	Ct =16,83
Reproductibilitatea	Nu există diferențe între rezultatele obținute de analişti diferiți care realizează amplificarea în acelaşi Termocycler	
Precizia	Valoare cât mai redusă a deviației standard pentru amplificarea aceleiaşi probe în 20 de repetiții	s = 0,638
Sensibilitatea	Cantitate cât mai redusă de ADN ce poate fi amplificată (< 1 µg)	500 ng

Liniaritatea	Dispersie redusă a valorilor individuale în jurul dreptei de regresie	
Robustețea	Influența minimă a variațiilor parametrilor metodei -Stabilitatea în timp a soluției de ADN izolat din parazitul *Varroa destructor* O. (amplificare ADN: izolat proaspăt - a, după 48h - b şi după 96h - c) -Influența temperaturii de atașare a primerilor	-În condițile prezervării probelor în condiții corespunzătoare, au fost obținute geluri identice.  a  b  c Metoda are un caracter robust dacă se lucrează la temperatura de atașare a primerilor de 50^0C.

Tabelul 32– continuare

1	2	3
Incertitudinea de măsurare	Stabilirea bugetului de incertitudini.	Cea mai mare contribuție le bugetul de incertitudini este adusă de volumul total de soluție supusă amplificării (soluție tampon + ADN izolat). 

Aceste constatări permit încadrarea metodei de izolare şi cuantificare şi amplificare a ADN din parazitul *Varroa destructor* O. în categoria celor care pot parcurge cu succes exigențele procedeelor de validare în condițiile asigurării calității în laboratoarele de biologie moleculară (IUPAC, ISO: 2005, 17025).

CONCLUZII

- Datorită faptului că finalitatea tezei de doctorat a vizat o abordare complexă a problematicii dezvoltării şi validării unei metode de genotipizare a parazitului *Varroa* sp. în stupinele din zona Transilvaniei, în conexiune cu particularitățile albinei melifere (*Apis mellifera* L.) din punctul de vederea al aspectelor etologice şi al mecanismelor de rezistență la boli şi paraziți, concluziile formulate debutează cu aceste aspecte.
- Privitor la studiul comportamentului igienic al *Apis mellifera* L., în stupinele din Transilvania, rezultatele studiului concretizate în înregistrarea valorilor medii ale procentului de descăpăcire cuprinse în intervalul 67 – 78% (cu valoarea medie minimă de 67,54% înregistrată în județul Harghita şi maximă de 78,72% în județul

Cluj) au demonstrat că în nici una dintre stupinele studiate, familiile de albine analizate nu au manifestat comportament igienic, limita de la care familiile de albine se consideră că manifestă rezistență naturală la boli şi paraziți ca urmare a comportamentului igienic fiind de 91%.

- Genotipul identificat în urma studiului nostru în stupinele din Transilvania, corespunde numărului de acces în Banca de Gene AF 106900 este genotipul China 2 (Anderson şi colab., 2000), unul dintre cele două genotipuri *Varroa* din cadrul varietății extreme de largi prezente în Asia capabile să paraziteze şi *Apis mellifera* L. Acesta se suprapune 100% cu genotipurile evidențiate de Ting Z. si col. (2004) în China, având numarul de acces în baza de date NCBI - AY372063.1 şi în Europa, de Solignac M. şi colab. (2005) având cu numărul de acces în baza de date NCBI AJ84872.1
- Cuantificarea parametrilor de performanță ai metodei de amplificare a ADN din parazitul *Varroa destructor* O. enumerați mai sus şi analiza rezultatelor obținute, confirmă faptul că aceasta corespunde scopului pentru care a fost selectată şi în consecință poate fi validată.

RECOMANDĂRI

- Pentru combaterea eficientă a parazitului *Varroa destructor* O. este necesară aplicarea unui management specific rezistenței la dăunători, ținându-se cont de faptul că orice organism, în condiții de constrângere, caută să găsească soluții de supraviețuire. Acest tip de management trebuie să includă tehnici legate de: bune practici în managementul stupului, menținerea unui grad redus de infestare, dar şi aplicarea produselor de combatere în cantitățile omologate şi de calitate ecologică.
- Identificarea rezistenței parazitului *Varroa destructor* O. la **Apistan** şi cuantificarea acesteia, constituie premisa pentru elaborarea unor strategii eficiente pentru combaterea parazitului. Cunoscându-se genotipul *Varroa* sp., precum şi faptul că rezistența se datorează apariției unei mutații punctiforme la nivelul genei canalului sodiului, prin

aplicarea secvenţierii se poate dezvolta un sistem de diagnoză eficient, bazat pe diferenţele genetice între formele rezistene şi cele sensibile.

- Este necesară implementarea, la nivel naţional, a unui sistem de monitorizare a formării şi dezvoltării rezistenţei parazitului *Varroa destructor* O. la tratamentul cu agenţi de combatere piretroidici, dar şi a celor pe bază de compuşi organofosforici sau antibiotice, deşi, alături de o metodologie competentă pentru diagnoza acesteia, utilizarea lor este din ce în ce mai rară datorită efectelor de remanenţă.
- Cuantificarea parametrilor de performanţă ai metodei de genotipizare a parazitului *Varroa destructor* O. (prin aplicarea directă la etapele de de izolare, cuantificare şi amplificare a ADN) şi analiza rezultatelor obţinute, în condiţiile Laboratorului Zonal de enotipizare a Animalelor Domestice, confirmă faptul că aceasta poate fi propusă spre validare, contribuind de această manieră la sporirea competenţei laboratorului.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Andersen C.L., J.L. Jensen and T. F. Ørntoft, 2004, **Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets**, Cancer research, No. 64, 5245 – 5250
2. den Besten P.J. 1998, **Cytochrome P450 monooxygenase system in echinoderms**, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, Vol. 121, No. 1 - 3, 139 – 146
3. Brown, T.A., 2002, **Genomes**, 2nd Edition, BIOS Scientific Publishers Ltd., 101, 121, 122
4. Bruneau E., Jacobs F., and Trouiller J., 1997, **Résultats de la campagne dedétection de la résistance de Varroa aux pyréthrinoïdes en Belgique - 1997**. Abeilles et Compagnie, No. 60, 5 – 6
5. Bura M., **Creşterea intensivă a albinelor**, 1996, Editura Helicon, Timişoara
6. Bura M., Silvia Pătruică, V.A. Bura, 2005, **Tehnologie Apicolă**, Ed. Solnes, Timişoara
7. Burkardt H. J., **Standardization and quality control of PCR analyses**, Clin. Chem. Lab. Med, 2000, Vol. 38, No. 2, 87 – 91
8. Căuia Eliza, 2006 - 2008, **Determinarea rezistenței naturale la boli a populațiilor de albine (*A. M. Carpatica*) din Romania pe baza unor teste specifice şi realizarea unei metodologii optime de ameliorare pentru acest character**, Proiect CEEX, Modulul II, EP
9. Colton T., 1974, **Statistics in Medicine**, Little Brown Publishers, 372 pag.
10. Coşier Viorica, A. Vlaic, 2007, **Abordarea practică a problemelor de genetică animală**, Editura Todesco, Cluj - Napoca

11. Defilando – Baker M. D., 1988, **Variability and biotypes of *Varroa jacobsoni* Oudemans**, American Bee Journal, Vol. 128, No. 8, 567 – 568
12. Dezmirean S. Daniel, L. Al. Mărghitaş, Graţia I. Dezmirean, G. Diniţă, O.Bobiş, L. Laslo, A. Moise, Antonia Odagiu, A. Fiţiu, I. Paşca, C. Bojan, Simona Bârsan, O. Maghear, C. Coroian, M. Man; 2007, **Reccomandations regarding prophylaxis of honey contamination during primary processing**, Apicultura – de la ştiinţă la agribusiness şi apiterapie, 82-84
13. Dezmirean D., L. Al. Mărghitaş, Oltica Giorgiana Stanciu, Otilia Bobiş, Laura Laslo, Adela Moise, O.Maghear, Cristina Bojan, 2008, **Mineral composition of honeydew honey produced in Transylvania determined by Atomic Absorbtion Spectrometry**, Bulletin USAMV-CN, Vol. 65, No.1 - 2, 233-237
14. Gonccalves M.C., M. M. Klerks, M. Verbeek, J. Vega, J. F. van den Heuvel, 2002, **The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of Sugarcane Yellow Leaf Virus**, European Journal of Plant Pathology No. 108, 401–407
15. de Graaf D.C., W. Ritter, F. J. Jacobs, Marleen Brunian, H. Inberechts, K. Mintiens, Y. Van der Stede, B. Verheyden, A.K. Fauske, P. Boujon, Gabriela Chioveanu, D. Dezmirean, G. Formato, F. Mutinelli, H.-J. Roest, D. Titera, S.F. Pernal, Katia Knapen, 2009, **Lessons from the first international proficiency test for the detection of spores from the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae***, Accreditation Quality Assurance, No. 14, 273-276
16. Martin S. J., 2004, **Acaricide (pyrethroid) resistance in Varroa destructor**, Bee World, No. 85, 67 - 69
17. Mărghitaş L. Al., 2003, **Albinele şi produsele lor**, Editura Ceres, Bucureşti
18. Mărghitaş L. Al., D. Dezmirean - Coordonatori, 2007, **Apicultura – de la ştiinţă la agribusiness şi apiterapie**, Editura AcademicPres, Cluj - Napoca
19. Milani N., G. Della Vedova, 2002, **Decline in the proportion of mites resistant to fluvalinate in a population of *Varroa destructor* not treated with pyrethroids**, Apidologie, No. 33, 417 - 422

20. Odagiu Antonia, A. Vlaic, L. Al. Mărghitaş, D. Dezmirean, I. Cornoiu, Laura Laslo, 2007, **Research into the hygienic behaviour of honeybees in Transylvania**, Proceedings of the 42nd Croatian&2nd International Symposium on Agriculture, 13-16 February, 302 – 306
21. Odagiu Antonia, A. Vlaic, L. Al. Mărghitaş, D. Dezmirean, 2007, **The hygienic behavior – testing honeybee colonies from Transylvanian area**, în **Apicultura – de la ştiinţă la agribusiness şi apiterapie**, Mărghitaş L. Al., D. Dezmirean - Coordonatori, Editura AcademicPres, Cluj – Napoca, 17 - 19
22. Odagiu Antonia., A.Vlaic, L. Al. Mărghitaş, I. Oroian, D. Dezmirean, Dana Pusta, 2008, **The Validation of the DNA Extraction Method from *Apis mellifera* L.**, Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Animal Science and Biotechnologies, Vol. 65, No.1 - 2, 387 – 390
23. Odagiu Antonia, I. Oroian, A. Vlaic, Al. Mărghitaş, P. Mazzone, E. Caprio, D. Dezmirean, 2009, **Assessing Linearity of the Parasite Varroa destructor DNA Amplification**, ProEnvironment/ProMediu, Vol. 2, No. 4, 226 – 229 (319 –322)
24. Patti Elzen and D. Westervelt, 2004, **A scientific note on reversion of fluvalinate resistance to a degree of susceptibility in *Varroa destructor***, Apidologie, No. 35, 519 – 520
25. Peirson S. N., J. N. Butler, and R. G. Foster, 2003, **Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis**, NucleicAcid Res., Vol. 31, No. 14, 118 – 125
26. Peters I. R., C. R. Helps, E. J. Hall, and M. J. Day, 2004, **Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design,** J. Immunol. Methods, Vol. 286, Nos. 1- 2, 203–217
27. Ponchel F., C. Toomes, K. Bransfield, F. T. Leong, Susan Douglas, Sarah Field, Sandra Bell, Valerie Combaret, A. Puisieux, A.J. Mighell, P. A. Robinson, C. F. Inglehearn, J. D. Isaacs and A. F. Markham, 2003, **Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions**, BMC Biotechnology, Vol. 3, No. 18, 1 – 13

28. Rakosy - Tican Elena, 2005, Inginerie genetica vegetala: note de curs, Casa Cărţii de Ştiinţă, Cluj-Napoca
29. Rakosy – Tican Elena, L. Al. Mărghitaş, 2007, **The bees as vehicles for transgene transfer from genetically moddified plants to other organisms – theoretical issues**, în **Apicultura – de la ştiinţă la agribusiness şi apiterapie**, Mărghitaş L. Al., D. Dezmirean - Coordonatori, Editura AcademicPres, Cluj – Napoca, 184 – 188
30. Rieu I. and S. J. Powers, 2009, **Real - Time Quantitative RT-PCR: Design, Calculations, and Statistics**, Plant Cell, No. 21, 1031 – 1033
31. Soderlund D. M., 2008, **Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels**, Pest Management Science, Vol. 64, No. 6, 610 - 616
32. Solignac M., D. Vautrin, E. Baudry, F. Mouguel, A. Loiseau and J-M Cornuet, 2004, **A Microsatelitte-Based Linkage Map of the Honeybee**, *Apis mellifera* L., Genetics, No. 167, 253 - 262
33. Spivak M., and G. S. Reuter, 2001, ***Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colonies selected for hygienic behavior**, Journal of Economic Entomology, Vol. 94, No. 2, 326 – 331
34. Tănase I. Gh., G. L. Radu, Al. Pană, Mihaela Buleandră, 2007, **Validarea metodelor analitice. Principii teoretice şi studii de caz**, Editura PRINTECH, Bucureşti
35. Vlaic A., 1997, **Inginerie geneticã, realizări, speranţe, nelinişti**, Editura Promedia – Plus
36. Vlaic A., T. Oroian, Simona Paşcalău, 2001, **Genotypization of bulls used for artificial insemination at k-casein and β-lactoglobulin locus,** Bulletin USAMV-CN, Vol. 55 – 56, 112 – 117
37. Vlaic A., T. Oroian, 2004, **Elemente de genetică pentru zootehnişti**, Editura AcademicPres, Cluj – Napoca
38. Vlaic A., Viorica Coşier, Antonia Odagiu, T. Oroian, V. Bâlteanu, 2005, **Analysis of genetic diversity in five cattle breeds from Romania**, Bulletin USAMV-CN, Seria ZB, Vol. 61, 332

39. Vlaic A., V. A. Bâlteanu, F. D. Pop, Anda Raluca Rusu, 2008, **Molecular methods used for detection of cattle milk in buffalo, ewe and dairy products**, Lucrări Ştiinţifice, seria Zootehnie, Iaşi, Vol. 51, 1016 - 1021
40. Ting Z., L. Anderson, Z. Y. Huang, S. Huang, J. Yao, T. Ken, Q. Zhang, 2004, **Identification of *Varroa* mites (Acari: Varroidae) infesting *Apis cerana* and *Apis mellifera* in China**, Apidologie, No. 35, 645 - 654
41. ***, 1993, ISO 3534 - 1/VIM, **International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology**, International Standards Organization, Geneva, Switzerland, IInd Edition
42. ***, 1995, SR 13 434, ISO/GUM, **Guide to the expression of uncertainty in measurement**, International Standards Organization, Geneva, Switzerland
43. ***, 2001, IUPAC Recommendations, **Selectivity in analytical chemistry**, Pure Applied Chemistry, Vol. 73, No. 8, 1381 - 1386
44. ***, 2003, **Validation of analytical procedures: Methodology**, International Conference on Harmonization Federal Register, Vol. 60, 27463
45. ***, 2003, **Ghidul ILAC-G17 privind incertitudinea de măsurare, SR ENV 13005**, International Standards Organization, Geneva, Switzerland
46. ***, 2005, **Standardul SR EN ISO/CEI 17025 : 2005**, International Standards Organization, Geneva, Switzerland